

Loopamp®サルモネラ検出試薬キット 新旧抽出法の検討結果

Loopamp®サルモネラ検出試薬キットは 2003 年 3 月の発売以降、多くの検査施設や食品会社などでご使用いただいておりますが、鶏肉や搾油かすなど脂質の多い試料の場合に、LAMP 反応が阻害を受け、培養法で陽性と判定される検体が LAMP 法では陰性となる場合があることが分りました。

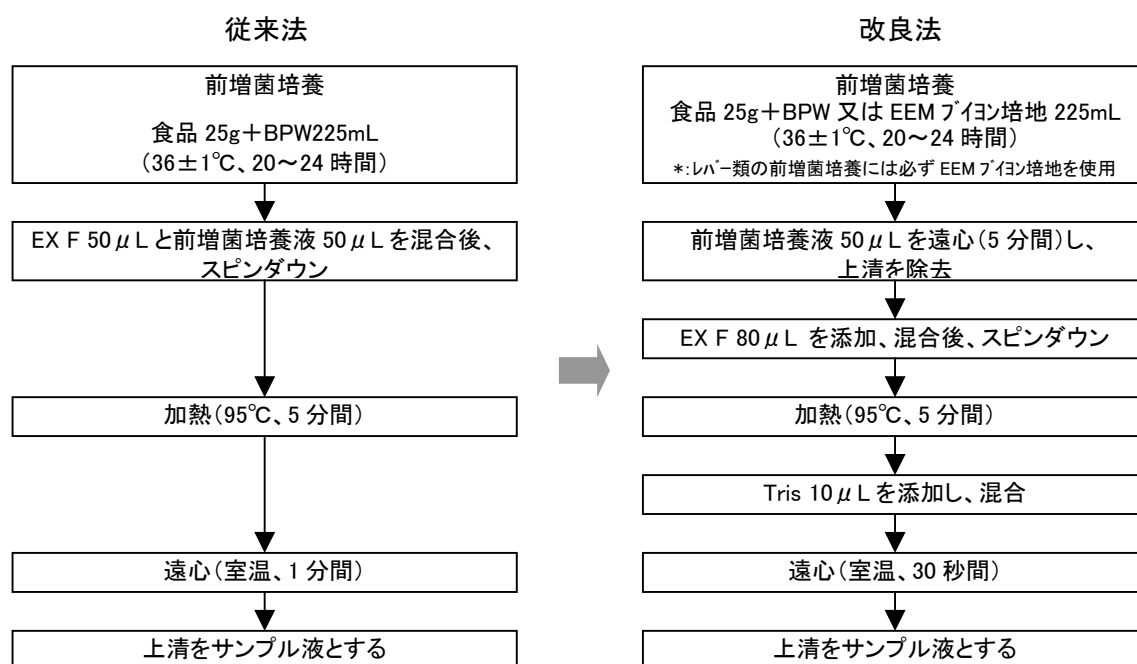
栄研化学株式会社にて検体抽出法改良の検討を行った結果、脂質の多い検体での反応阻害を良好に回避できるだけでなく、従来の抽出法(以下、従来法)で問題なく検出できている検体においても、反応速度が早くなり、ピロリン酸マグネシウムによる濁度上昇がより明瞭になる、新しい抽出法(改良法)を確立することができました。また、従来法では EEM ブイヨン培地自体による反応阻害が知られていましたが、改良法ではその阻害が回避されることも分りました。

これらのことから、この抽出法をすべての検体に適用することとし、キット内容、使用法および取扱説明書内容を変更させていただきました。以下に、各種検体および培地を用いた新旧抽出法の検討結果をお示しします。

1. 改良法の手順

改良法では、従来の抽出法に、前増菌培養液の遠心・上清除去と加熱変性後の中和といった工程が加わることになります。

まず、各チューブに検体である前増菌培養液 50 μ L を採取し、5 分間遠心します。次に沈殿物を吸引しないよう可能な限り上清をピペットで除去します。沈殿物がない場合には上清を約 40 μ L 除去します。そこに、Extraction Solution for Foods (EX F) 80 μ L を添加、混合、微量簡易遠心機で数秒間遠心(スピンドアウン)した後、95°C、5 分間加熱処理します。さらに 1M Tris-HCl:pH 7.0 (Tris) 10 μ L を添加、混合し、室温で 30 秒間遠心後、上清をサンプル溶液とします(下図。詳細は、取扱説明書をご確認ください)。



2. 抽出法の検討結果

[検討方法]

各検体 25g とサルモネラ用液体培地(緩衝ペプトン水(以下、BPW)および EEM ブイヨン培地(以下、EEM)) 225mL を混合し、スタマッキング処理した液を 37°C で 24 時間(一部 16 時間)増菌培養した後に、*Salmonella* Enteritidis 培養菌体を 2.4×10^5 CFU/mL または 2.4×10^4 CFU/mL となるように添加して擬似検体としました。

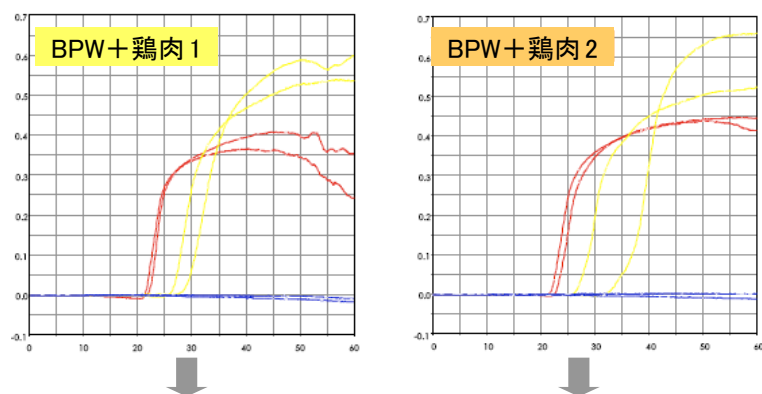
これらの培養菌体を従来法および改良法によりそれぞれ抽出操作を行ったサンプル溶液より、それぞれ 5 μ L (600 CFU/test または 60 CFU/test)を用いて LAMP 反応を行いました。

以下は食材および培地による LAMP 反応の結果です。

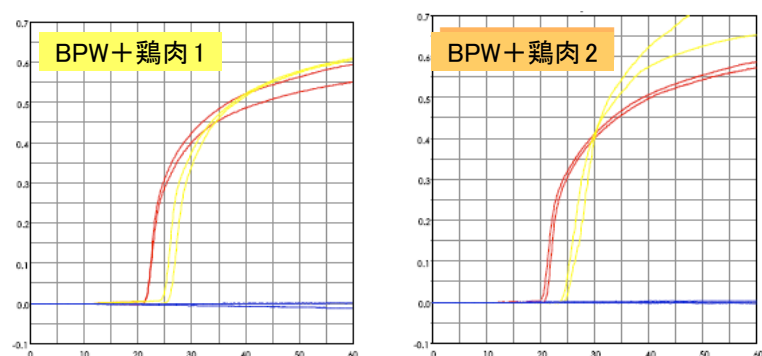
1) 鶏肉を検体とした場合

鶏肉では、従来法で抽出した場合、脂質成分によって LAMP 反応が阻害を受ける場合があることが分かりました。本検討で使用した検体でも、BPW で培養した場合、従来法では弱い濁度上昇の阻害が確認されました。それに対して改良法を用いることにより、反応曲線の上昇パターンが明瞭となりました。

<従来法>



<改良法>

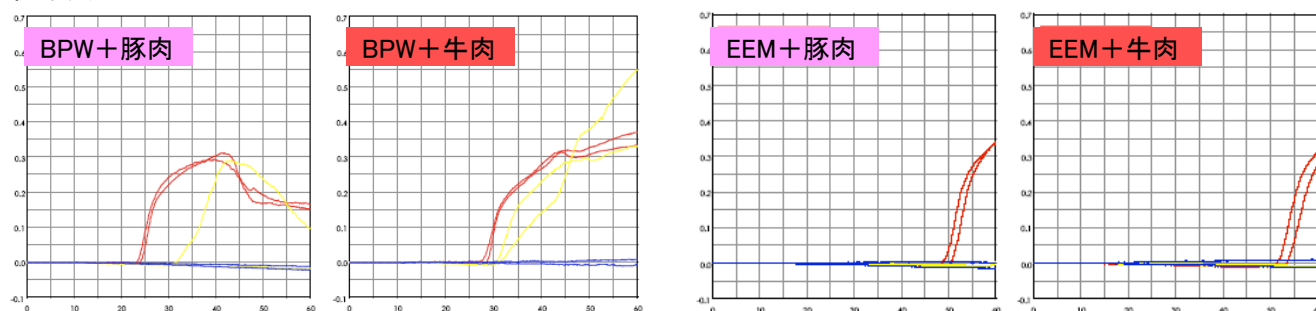


— 2.4×10^5 CFU/mL (600 CFU/test)
— 2.4×10^4 CFU/mL (60 CFU/test)
— 0 CFU/mL (0 CFU/test)

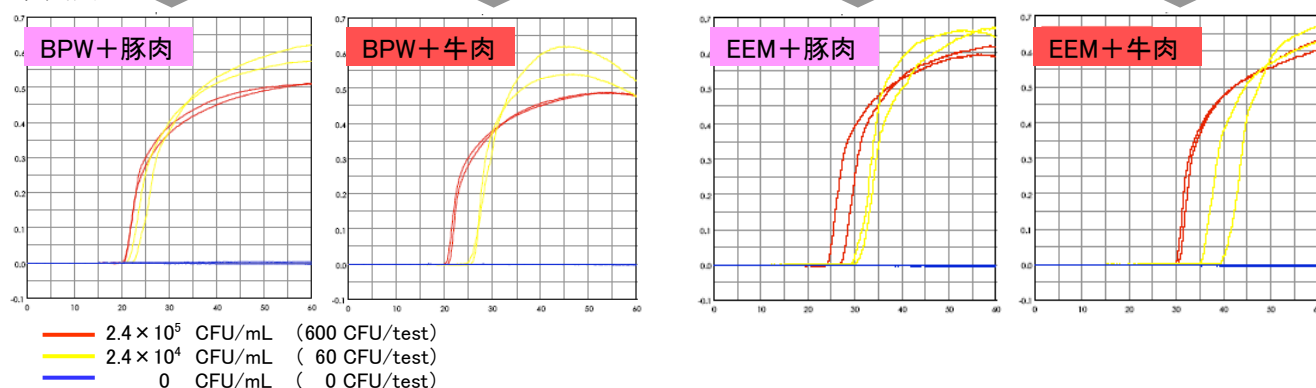
2) 豚肉、牛肉および牛レバーを検体とした場合

食肉類の検討では、BPWで培養した場合、従来法では豚肉、牛肉ともに、濁度上昇が抑制されていましたが、改良法により明瞭なパターンとなり、かつ、より増幅開始が早まる傾向が見られました。EEMで培養した場合、従来法ではBPWに比べてさらに強い阻害が認められていましたが、改良法により、反応開始時間はBPWに比べて遅いものの、増幅開始が大幅に早くなり、問題なく増幅が確認できました。

<従来法>

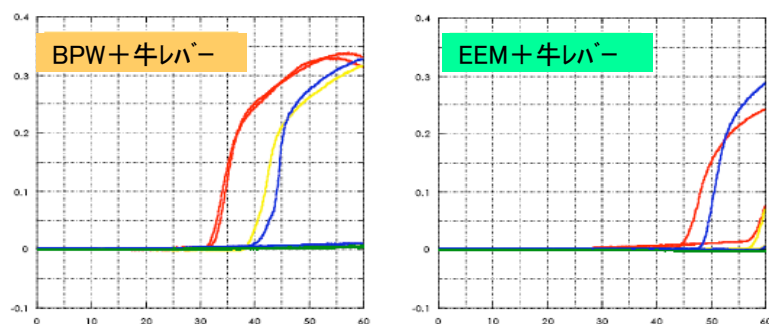


<改良法>

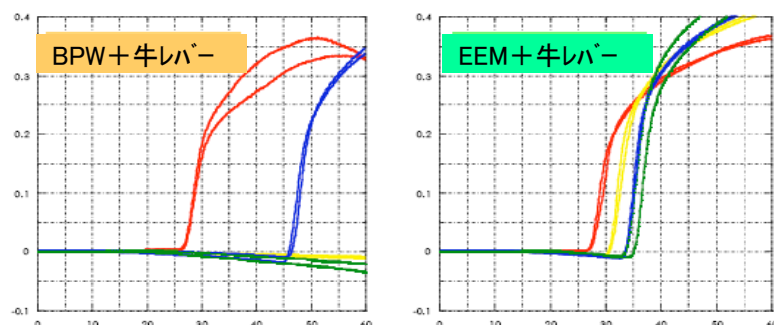


牛レバーを用いた検討では、4つの検体(検体A,B,C,D)を対象とし、前増菌培養液で16時間培養した液に菌液(2.4×10^5 CFU/mL)を加えました。BPWを用いた場合、従来法では反応阻害が認められ、60分以内に増幅反応が確認できない検体がありました。改良法を用いた場合は、むしろ阻害が強まる検体が認められました。EEMを用いた場合、従来法ではBPWよりもさらに強い反応阻害が見られたにも関わらず、改良法ではいずれの検体も問題なく測定できるようになりました。このことから、牛レバーの前増菌培養には必ずEEMをご使用くださるようお願いいたします。

<従来法>



<改良法>

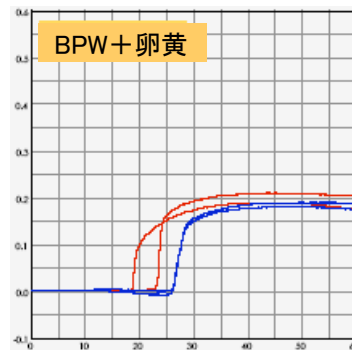
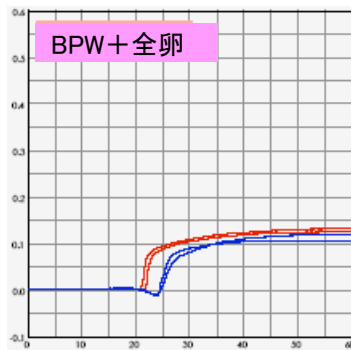


牛レバー検体 A
 牛レバー検体 B
 牛レバー検体 C
 牛レバー検体 D

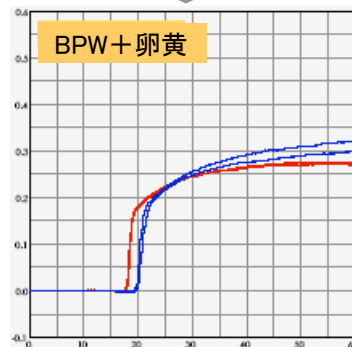
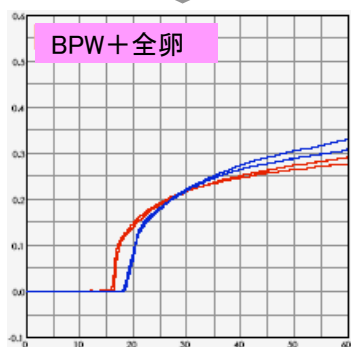
3) 卵を検体とした場合

全卵、卵黄を BPW で培養した検討では、従来法では増幅は確認できるものの濁度上昇が著しく抑制されていました。改良法を用いることにより、濁度が上昇する傾向が見られただけでなく、反応開始時間もより早くなる傾向が見られました。培養液中に含まれる LAMP 反応を阻害する因子が、遠心操作によって除去されたことに起因すると考えられました。

〈従来法〉



〈改良法〉

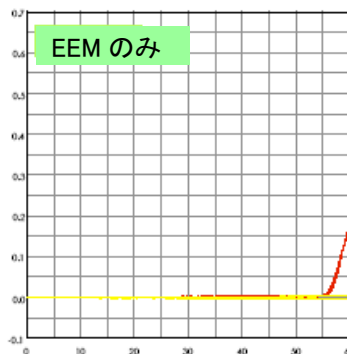
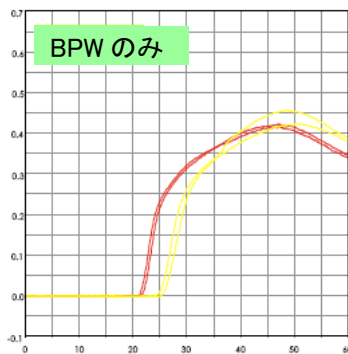


— 2.4×10^5 CFU/mL (600 CFU/test)
— 2.4×10^4 CFU/mL (60 CFU/test)

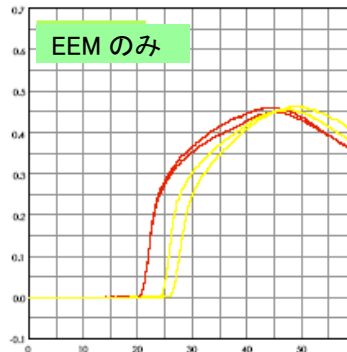
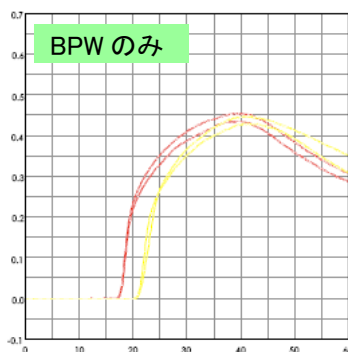
4) 増菌培地 (BPW および EEM) のみの場合

培地のみを 37℃ に 24 時間置いた後に菌体を添加したところ、BPW の場合、改良法では従来法に比べて反応開始時間が早まることが確認されました。一方、EEM の場合は、60 CFU/test では 60 分以内に増幅が確認できませんでしたが、改良法を用いることにより、反応開始後 25 分前後から濁度上昇が確認できました。

〈従来法〉



〈改良法〉

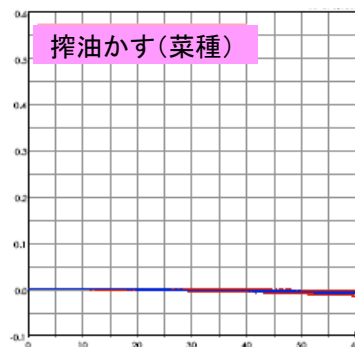
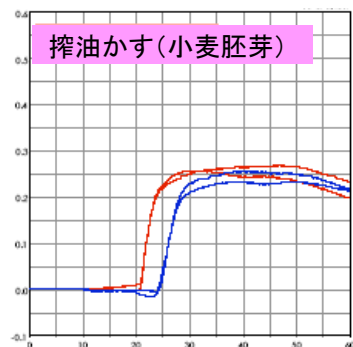


— 2.4×10^5 CFU/mL (600 CFU/test)
— 2.4×10^4 CFU/mL (60 CFU/test)

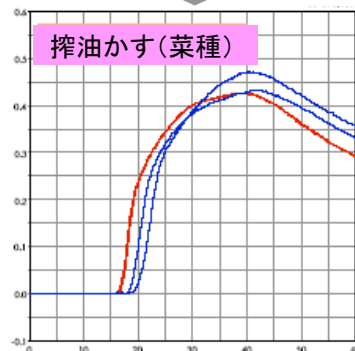
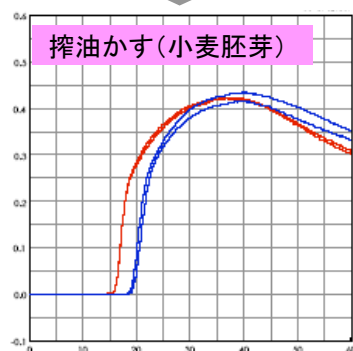
5) 搾油かすを検体とした場合

搾油かすを用いた検討では、BPW で培養した液に培養菌体を添加しました。小麦の搾油かすでは、従来法で見られた濁度上昇の阻害が改良法により改善し、反応曲線がより明瞭となり、かつ反応もより早く開始しました。菜種の搾油かすでは、従来法では濁度の上昇が全く見られませんでした、改良法では反応開始 20 分前後から増幅が確認されました。

<従来法>



<改良法>



— 2.4×10^5 CFU/mL (600 CFU/test)
— 2.4×10^4 CFU/mL (60 CFU/test)